

0-775228

На правах рукописи

Зощук Святослав Анатольевич

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВЫСОКОПОВТОРЯЮЩИХСЯ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК РАЗНЫХ ТИПОВ НА
ХРОМОСОМАХ *Triticum* и *Aegilops***

03.00.03 – молекулярная биология

03.00.15 - генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2009

**Работа выполнена в Лаборатории молекулярной кариологии и основ
клеточной терапии Учреждения Российской академии наук
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН**

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Бадаева Екатерина Дмитриевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Соловьев Александр Александрович

кандидат биологических наук
Зацепина Ольга Георгиевна

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО
РАН, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится "19" марта 2009 г. в "12" часов на
заседании диссертационного совета 002.235.01 при Учреждении Российской
академии наук Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта
РАН по адресу:

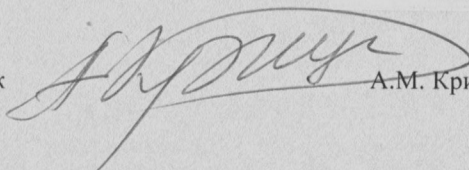
119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

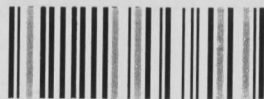
Автореферат разослан "16" февраля 2009 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета
кандидат химических наук



НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000525875

А.М. Крицын

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Повторяющиеся последовательности ДНК (ПП) являются основным компонентом генома растений. По разным данным, у злаков к ним может относиться до 90-95% ядерной ДНК (Flavell *et al.*, 1974; Li *et al.*, 2004). ПП представляют собой высоко гетерогенную группу, представленную тысячами или даже десятками тысяч семейств, отличающихся по длине мотива, уровню копийности и организации в геноме (Heslop-Harrison, 2000). Детальные исследования геномов многих важных культур, включая пшеницу, ячмень, рис, сахарную свеклу и другие виды, показали, что наиболее обширным классом повторов ДНК у растений являются LTR-ретротранспозоны, составляющие свыше 50% размера их геномов (Bennetzen, 2000; Li *et al.*, 2004; Sharma and Raina, 2005). От 5 до 11% ДНК представлено транспозонами, а на долю остальных классов повторяющихся последовательностей приходится около 30% ядерной ДНК.

Причины поддержания столь значительного количества повторов, а также высокого разнообразия их состава до конца не изучены. Предполагают, что они играют важную роль в стабилизации и поддержании структуры хромосом, участвуют в «узнавании» и правильном их расхождении во время митоза и мейоза (Vershinin *et al.*, 1995), выступают точками рекомбинации в мейозе (Linares *et al.*, 1998), выполняют функцию защиты теломер и участвуют в регуляции активности генов (Sykорова *et al.*, 2006). Видообразование у растений часто связано с быстрыми изменениями фракции ПП (Flavell *et al.*, 1979; Cuadrado and Jouve, 2002). Неудивительно, что они привлекают внимание исследователей. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в их изучении в последние годы, число идентифицированных семейств повторов все еще крайне мало, а в практической цитогенетике, как зонды для флуоресцентной гибридизации *in situ*, применяется еще меньшее их количество. Поэтому важной задачей является поиск новых генетических маркеров, которые могли бы использоваться в изучении процессов, сопровождающих дивергенцию и становление видов.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы стало изучение структуры и эволюции геномов злаков на основе локализации трех семейств тандемно организованных, высокоповторяющихся, некодирующих последовательностей ДНК методом флуоресцентной гибридизации *in situ*. Для ее выполнения были поставлены следующие задачи:

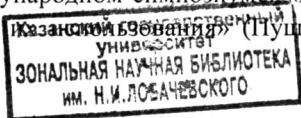
- Оценить популяционный полиморфизм сателлитных повторов Spelt-1 и Spelt-52. Изучить преобразования этих повторов в двух эволюционных линиях пшеницы - группе Emmer и Timopheevi.

- Исследовать распределение нового, ранее не известного семейства повторяющихся последовательностей Fat на хромосомах злаков методом FISH. Определить возможное время его возникновения в процессе эволюции.
- Оценить эффективность использования Fat повтора как маркера для идентификации хромосом в гибридизации *in situ* и изучения эволюции растений.

Научная новизна работы. В работе с помощью метода гибридизации *in situ* впервые проведена локализация новой высокоповторяющейся последовательности Fat, выделенной из концевых последовательностей ВАС клонов библиотеки 3В хромосомы пшеницы (Paux *et al.*, 2006), на хромосомах разных видов и родов злаков и изучена структура и эволюция их геномов. На ее основе разработан новый тип маркеров, который может быть использован для идентификации хромосом и анализа эволюции геномов методом FISH. Впервые проведено картирование двух семейств tandemных повторов Spelt-1 и Spelt-52 на хромосомах полиплоидных пшениц и выявлены механизмы, лежащие в основе внутривидового и межвидового полиморфизма по содержанию этих последовательностей, а также изменений данных повторов при полиплоидизации.

Научно-практическое значение работы. Изучение распределения ПП позволит уточнить пути и цитогенетические процессы, приводящие к образованию новых разновидностей и даже видов злаков. Использование сочетания двух специфичных для D-генома повторов Fat и pAs1 существенно повышает разрешающую способность FISH и расширяет возможности более точной идентификации хромосом некоторых геномов, а также отдельных районов хромосом, что имеет большое значение при анализе эволюционных процессов. Полученная информация будет способствовать углублению представлений о структурной организации хромосом пшениц, эгилопсов и других злаков. Результаты, полученные в работе, могут быть использованы в селекции злаков, при чтении лекций на биологических факультетах университетов, педагогических и сельскохозяйственных ВУЗов.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы были представлены на V Международном совещании и школе молодых ученых: «Кариология, кариосистематика и молекулярная систематика растений» (Санкт-Петербург, Россия, 12-15 октября 2005 г.), на Международной конференции: «Полиплоидия и цитология» (Бордо, Франция 5-7 апреля 2006г.), на отчетной конференции по Программе РАН: «Динамика генофондов растений, животных и человека» (Москва, Россия, 2006 г., 2007 г., 2008 г.), на VII Международном симпозиуме: «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пушино, Россия, 18-22 июня



2007 г.), на II Вавиловской международной конференции: «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы» (Санкт-Петербург, Россия, 26-30 ноября 2007 г.), на XII Делегатском Съезде Российского Ботанического Общества и научной конференции: «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века» (Петрозаводск, Россия, 22-27 сентября 2008 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 статей в отечественных и зарубежных журналах и 5 сообщений в форме тезисов.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 153 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы из 508 источников. Диссертация иллюстрирована 34 рисунками и 14 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы состоит из трех разделов: (1) Организация генома растений; (2) Векторные системы, используемые для клонирования ДНК; (3) Пшеницы и *Aegilops* как модельные системы для изучения организации и эволюции генома растений. В конце главы приводится заключение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Растительный материал. В работе исследованы 105 образцов, относящихся к 45 видам злаков. Среди них 54 образца 13-ти видов пшениц (*Triticum*), 43 образца 24-х видов *Aegilops*, 4 вида ячменя (*Hordeum*), и по одному образцу ржи (*Secale cereale*), овса (*Avena magna*), пырея (*Agropyron intermedium*) и пшенично-ржаного гибрида (*Triticale*). Виды отличались по уровню плоидности и геномному составу. Материал был получен из коллекций Государственного научного центра РФ Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова РАСХН (С.-Петербург, Россия), Национального центра генетических ресурсов INRA (Клермон-Ферран, Франция), Центра генетических ресурсов пшеницы Университета штата Канзас (США), Университета Киото (Япония), Института генетики растений и исследования сельскохозяйственных культур (Гатерслебен, Германия), Института эволюции Университета Хайфы и Отдела генетики растений Вейцмановского института науки (Израиль), ICARDA (Сирия).

ДНК-последовательности. В работе были использованы семь ДНК-зондов.

- **Spelt-1.** ДНК-фрагмент длиной 150 п.н., выделен из геномной ДНК *Aegilops speltoides* var. *ligustica* и встроен в плазмиду pBluescript II SK+

(Салина *и др.*, 1997; Salina *et al.*, 1998). Относится к классу tandemно организованных последовательностей ДНК кластерного типа.

- **Spelt-52.** Состоит из фрагмента ДНК длиной 276 п.н., выделенного из геномной ДНК *Aegilops speltoides* var. *ligustica* и встроенного в плазмиду pBluescript II SK+ (Salina *et al.*, 2004). Относится к классу tandemно организованных последовательностей ДНК кластерного типа.
- **Fat.** Последовательность длиной 500 п.н., выделена из концевых последовательностей ВАС клонов 3В хромосомы мягкой пшеницы (Paux *et al.*, 2006).
- **pAs1.** Последовательность длиной 1000 п.н., выделена из генома *Aegilops squarrosa* (syn.=*Ae. tauschii*) и встроена в плазмиду pUC8 (Rayburn and Gill, 1986).
- **pSc119.2.** ДНК-фрагмент длиной 120 п.н., изолированный из теломерного гетерохроматина ржи *Secale cereale*, клонированный в плазмиду pBR322 (Bedbrook *et al.*, 1980) и переклонированный (McIntyre *et al.*, 1990).
- **pTa71.** EcoRI фрагмент рДНК мягкой пшеницы *Triticum aestivum* длиной 9 т.п.н., встроенный в плазмиду pUC19. Содержит кодирующие участки генов 18S, 5,8S и 26S рРНК и спейсерные последовательности (Gerlach and Bedbrook, 1979).
- **pTa794.** содержит BamHI фрагмент рДНК мягкой пшеницы *Triticum aestivum* длиной 410 п.н., встроенный в плазмиду pBR322 (Gerlach and Dyer, 1980). Включает ген 5S рРНК длиной 120 п.н. и нетранскрибируемый спейсерный участок длиной 290 п.н.

Методы. Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью метода щелочного лизиса (Maniatis *et al.*, 1982). Меченные с помощью ПЦР зонды Spelt-1 и Spelt-52 были любезно предоставлены д.б.н. Е.А. Салиной (Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия). Проба Fat, меченная флуоресцеином с помощью ПЦР, предоставлена Dr. E. Paux (INRA, France). pSc119.2, pAs1, pTa71 и pTa794 метили с помощью ник-трансляции в соответствии с рекомендациями фирмы производителя (Boehringer-Roche, Германия).

Двойную флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) проводили по стандартной методике (Badaeva *et al.*, 1996) с небольшими модификациями. Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Leitz Wetzlar и фотографировали с помощью CCD-камеры Photometrix Cool-Snap (USA). Изображения обрабатывали с использованием пакета программ Adobe Photoshop^R, версия 8.0 (Adobe Systems, Edinburgh, UK).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ ГЕНОМОВ ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ Spelt-1 И Spelt-52-ПОВТОРОВ

Особенности распределения последовательностей Spelt-1 и Spelt-52 на хромосомах *Aegilops speltoides*

При гибридизации со Spelt-1 зондом на хромосомах разных растений *Ae. speltoides* было выявлено от 23 до 26 сигналов на диплоидный геном. Метка находилась в субтеломерных участках обоих плеч подавляющего большинства хромосом (рис. 1d). В некоторых позициях она присутствовала лишь в одном из гомологов, или же сигналы на гомологичных хромосомах существенно отличались по размеру. Относительно постоянная картина по интенсивности гибридизации отмечена лишь для двух локусов - в теломере длинного плеча хромосомы 4S наблюдались яркие Spelt-1 сигналы практически всех изученных растений, а в теломере спутника хромосомы 6S они, наоборот, были в основном небольшого размера.

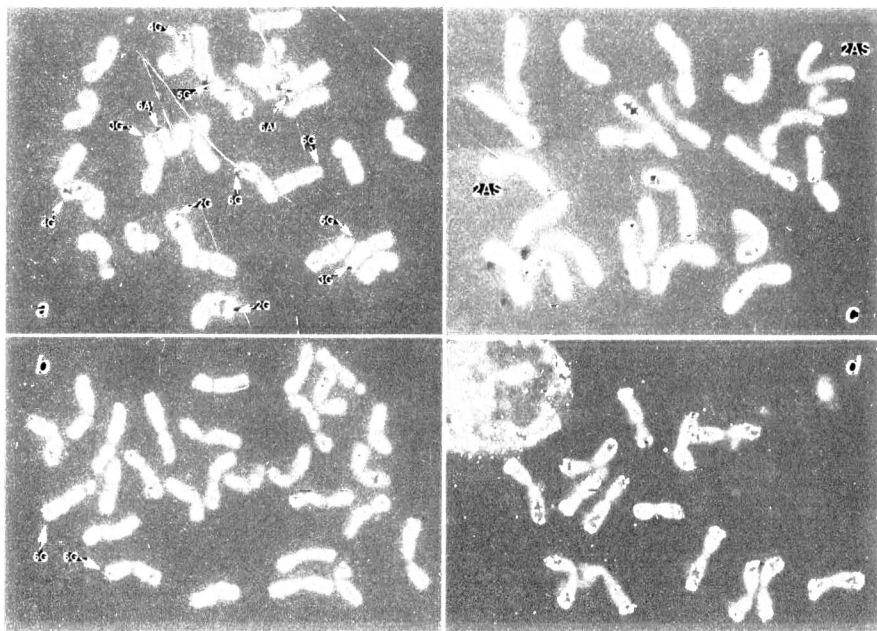


Рисунок 1. Распределение Spelt-1 (a,c,d) и Spelt-52 (b) повторов (зеленый сигнал) на хромосомах *Triticum araraticum* Tri11939 (a,b), *T. dicoccoides* PI467013 (c) и *Ae. speltoides* к-1595 (d). pSc119.2 зонд – красный сигнал.

При гибридизации Spelt-52 повтора с хромосомами *Ae. Speltoides* было получено 7 сигналов (на диплоидный геном), варьирующих по размеру и

расположенных в субтеломерных (7SS) или интерстициальных (1SS, 3SL и 6SS) участках хромосом. На каждую хромосому приходилось по два сайта, за исключением хромосомы 1S, где метка присутствовала только в одном из гомологов.

Исследование распределения Spelt-1 и Spelt-52 повторов на хромосомах полиплоидных пшениц группы Timopheevi

Локализация Spelt-1 повтора на хромосомах видов группы Timopheevi

Triticum araraticum. Идентификацию хромосом, содержащих Spelt-1/Spelt-52 сигналы, проводили на основании рисунков гибридизации с pSc119.2 зондом (рис. 1a,b). Хромосомы всех образцов *T. Araraticum* гибридизовались со Spelt-1 повтором. Количество, интенсивность, а также хромосомная локализация сигналов варьировала между образцами (табл. 1). На каждую из хромосом приходилось только по одному локусу, расположенному в субтеломерной области короткого или длинного плеча. Общее число сайтов составило четыре, пять и шесть пар для разных образцов. Среднее количество локусов на гаплоидный геном у пшениц этой группы равнялось 5,3.

Можно отметить, что в целом каждая хромосома G-генома *T. Araraticum* метилась Spelt-1 повтором как минимум в одном образце, однако в каждом конкретном кариотипе были представлены не все возможные позиции зонда (табл. 1, рис. 1a). Что касается второго генома *T. Araraticum*, то гибридизацию с повтором Spelt-1 получали только на двух хромосомах. Стабильно метилась хромосома 6A^t – очень крупный сигнал, локализованный в субтеломерной области спутника, выявлялся в шести из семи образцов. Следует отметить, что этот участок хромосомы 6A^t был перенесен из хромосомы 1G в результате видоспецифической транслокации 1G:4G:6A^t (Jiang, Gill, 1994). Второй локус был обнаружен в субтеломерной области длинного плеча 2A^t хромосомы. Его наличие в A^t геноме *T. Araraticum* может быть связано с амплификацией Spelt-1 последовательности, присутствующей в геноме диплоидной пшеницы в небольшом числе копий (Salina *et al.*, 1998), вследствие аллополиплоидизации.

Triticum timopheevii и *T. Kiharae*. С помощью гибридизации *in situ* была определена локализация Spelt-1 повтора на хромосомах двух образцов *T. Timopheevii* и одного *T. kiharae* – аллополиплоидного гибрида *T. Timopheevii* x *T. Tauschii*. В отличие от *T. Araraticum*, у них не было вариации по распределению Spelt-1 последовательности на хромосомах. Все образцы содержали по шесть сайтов гибридизации (на гаплоидный геном). Сигналы

Таблица 1. Распределение повтора Spelt-1 на хромосомах пшеницы группы Timopheevi

Вид	№ образца	Общее число сайтов	Плецо хромосомы								
			2A ¹ L	6A ¹ S	1GL	2GL	3GL	4GL	5GL	6GS	7GS
<i>T. aragaisii</i>	Tri11365	5	-	XL	L	-	-	M	M	S	-
	Tri11508	5	M	-	-	-	XL	M	S	-	L
	Tri11509	5	-	XL	-	XL	L	M	-	S	-
	Tri11939	6	-	XL	-	XL	M	S	S	S	-
	Tri16599	5	-	XL	L	-	-	M	M	S	-
	Tri17418	4	-	XL	S	-	-	M	M	-	-
	Tri17419	5	-	XL	-	M	-	M	M	L	-
<i>T. timopheevii</i>	#21	6	S	XL	M	M	-	M	M	-	-
	Tri26	6	S	XL	L	L	-	M	M	-	-
<i>T. kiharae</i>	K-47897	6	S	XL	M	L	-	M	M	-	-

*размер участка гибридизации: XS - очень маленький; S - маленький; M - средний; L - большой; XL - максимальный

располагались на двух хромосомах A^t-генома (2A^t и 6A^t) и четырех хромосомах G-генома (1G, 2G, 4G и 5G).

Таким образом, у видов группы Timopheevi Spelt-1 повтор выявлялся на всех хромосомах G-генома и двух хромосомах A^t генома, но лишь в одном из хромосомных плеч – длинном (1G, 2G, 3G, 4G и 5G) или коротком (6G и 7G). Общее число потенциальных сайтов составляло девять, однако в индивидуальных образцах были представлены лишь четыре-шесть из них.

Локализация Spelt-52 повтора на хромосомах Triticum araraticum, T. timopheevii и T. kiharae

Гибридизация Spelt-52 повтора проведена на трех образцах *T. araraticum*, двух *T. timopheevii* и *T. kiharae*. Количество сигналов в различных образцах изменялось от двух до восьми (1-4 пары хромосом) (рис. 1b). Образцы варьировали также по хромосомной локализации сигналов и их интенсивности (табл. 2). У *T. araraticum* Spelt-52 повтор присутствовал на двух хромосомах G-генома (1GS, 6GL) и трех хромосомах A^t-генома (2A^tS, 4A^tS и 6A^tS). Хромосомы *Triticum timopheevii* и *T. kiharae* имели одинаковые рисунки мечения Spelt-52 повтором: сигналы обнаружены только в коротких плечах хромосом 2A^t и 1G. Оба локуса имели средний размер и располагались в субтеломерной области хромосом.

Таблица 2. Распределение повтора Spelt-52 на хромосомах полиплоидных пшениц группы Timopheevi

Вид	Линии	Число сайтов на гапл. геном	Плечо хромосомы				
			2A ^t S	4A ^t S	6A ^t S	1GS	6GL
<i>T. araraticum</i>	Tri11508	3	-	L	S	S	-
	Tri11939	1	-	-	-	-	L
	Tri17418	1	-	-	-	-	XL
<i>T. timopheevii</i>	Tri26	2	M	-	-	M	-
<i>T. kiharae</i>	K-47897	2	M	-	-	M	-

* величина сигнала: S – малый; M – средний; L – большой; XL – очень большой.

Таким образом, в отличие от семейства Spelt-1, Spelt-52 последовательность была представлена в геномах пшениц группы Timopheevi значительно меньшим числом копий. Общее количество сайтов на гаплоидный геном варьировало от 1 до 4, что примерно вдвое ниже, чем у Spelt-1 (4-7). Помимо этого, гибридизационные сигналы Spelt-52 повтора, как правило, были меньшего размера. В распределении зонда Spelt-52 выявлены тенденции, сходные со Spelt-1 зондом. А именно, у *T. araraticum* обнаружен полиморфизм по количеству, интенсивности и распределению сайтов на

хромосомах, тогда как *T. timopheevii* и *T. kiharae* имели идентичные картины гибридизации с этим повтором.

Последовательность Spelt-52 в геномах полиплоидных пшениц группы Emmer не обнаружена, поэтому в работе приводятся только результаты гибридизации Spelt-1 зонда с хромосомами видов этой группы.

Локализация Spelt-1 повтора на хромосомах полиплоидных пшениц группы Emmer

Тетраплоидные виды

Распределение Spelt-1 повтора изучали на 26 растениях, представляющих 25 образцов, относящихся к шести видам тетраплоидной пшеницы. Количество, интенсивность, а также хромосомная локализация Spelt-1 сигналов варьировала между образцами (табл. 3). Число сайтов на гаплоидный геном составляло три (у одного образца), два - у девяти образцов и по одному (рис. 1с) - у девяти образцов (десяти растений). На хромосомах десяти образцов, относящихся к пяти видам, гибридизационных сигналов не обнаружено вообще. Таким образом, среднее число сайтов Spelt-1 повтора на гаплоидный геном у тетраплоидных видов пшеницы составило 1,19.

Сравнение распределения Spelt-1 зонда на хромосомах разных образцов пшениц группы эммер показало, что в них можно идентифицировать семь потенциальных сайтов локализации этого повтора, расположенных в субтерминальных районах коротких и длинных плеч пяти хромосом. На одну хромосому приходилось только по одному локусу, за исключением 2А и 6В, где сигналы могли находиться или в коротком, или в длинном плече, но никогда вместе в одном генотипе. Наиболее широкий полиморфизм рисунков гибридизации был отмечен у *T. dicoccoides*, в котором были представлены шесть из семи потенциальных сайтов Spelt-1 повтора (табл. 3). В двух растениях *T. dicoccoides* (PI467013), имевших идентичные рисунки С-окрашивания, выявлены различия по локализации сигналов Spelt-1. У других видов полиморфизм был существенно ниже.

Локализация Spelt-1 повтора на хромосомах гексаплоидных пшениц

Spelt-1 повтор был локализован на хромосомах шести сортов *T. aestivum* и одного образца спельты. Лишь в двух сортах мягкой пшеницы и спельте выявлено по одному сигналу. Все варианты, обнаруженные у мягких пшениц, встречались и у тетраплоидных эммеров. Однако если в тетраплоидных видах представлены все семь, то в гексаплоидных – только три потенциальных локуса. Помимо этого, у гексаплоидных видов заметно снижено число сайтов на гаплоидный геном – до 0,43.

Таблица 3. Распределение повтора Spelt-1 на хромосомах полиплоидных пшениц (размер сигнала: М-средний; L-большой)

Вид, плоидность	Номер образца/ сорт	Сайтов. на гаплондн.. геном	Плецо хромосомы						
			1BS	2AS	2AL	2BL	3BL	6BS	6BL
<i>T. dicoccoides</i> (2n=28)	TTD20	1	-	-	-	-	-	L	-
	PI478703	1	-	-	-	-	L	-	-
	PI538657	2	-	-	L	-	L	-	-
	PI467013	1	-	-	-	-	-	L	-
		1	-	L	-	-	-	-	-
	PI428126	0	-	-	-	-	-	-	-
	PI471750	3	-	-	L	L	-	L	-
	IG46148	2	L	-	L	-	-	-	-
	IG116181	2	L	-	-	L	-	-	-
<i>T. dicoccum</i> (2n=28)	K-7146	2	-	-	L	L	-	-	-
	K-5154	2	-	M	-	L	-	-	-
	K-45544	1	-	-	-	L	-	-	-
	K-7141	1	-	-	L	-	-	-	-
	K-15840	1	-	-	-	-	-	L	-
	K-21007	2	-	-	L	L	-	-	-
	K-19256	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. polonicum</i> (2n=28)	K-43335	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. carthlicum</i> (2n=28)	K-19726	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. durum</i> (2n=28)	Langdon	1	-	-	-	-	-	-	L
	Краснокутка	2	-	M	-	-	L	-	-
<i>T. aethiopicum</i> (2n=28)	K-19217	0	-	-	-	-	-	-	-
	K-19289	2	-	-	-	L	-	L	-
	K-19305	0	-	-	-	-	-	-	-
	K-19321	2	-	-	L	L	-	-	-
	K-43767	1	-	-	-	L	-	-	-
	K-44505	0/1	-	-	-	-/L	-	-	-
<i>T. aestivum</i> (2n=42)	Chinese spring	0	-	-	-	-	-	-	-
	Courtot	0	-	-	-	-	-	-	-
	Мирон. 808	1	-	-	-	-	-	-	L
	K-14999	0	-	-	-	-	-	-	-
	K-38034	0	-	-	-	-	-	-	-
	VPM-1	1	-	-	-	L	-	-	-
<i>T. spelta</i> (2n=42)	K-152	1	-	-	-	-	-	L	-

Изменение Spelt-1 в процессе эволюции полиплоидных пшениц

Предполагают, что *T. araraticum* образовался в результате гибридизации *Ae. speltoides* с *T. urartu* (Dvorak, 1998; Бадаева, 2000; Feldman, 2001). Наличие специфического для *Ae. speltoides* повтора (он не обнаружен в геномах других видов *Aegilops* секции Sitopsis) на всех хромосомах G-генома и большинстве хромосом В-генома еще раз подтверждает родство пшениц группы Эммер и Тимофеева, а также то, что именно *Ae. speltoides* послужил донором этих геномов пшеницы. *Ae. speltoides* и пшеницы показали значительную внутривидовую изменчивость распределения Spelt-1 повтора. Поскольку размер сигналов гибридизации отражает уровень копийности последовательности в геноме, мы смогли приблизительно оценить изменение ее содержания в геномах видов, представляющих две эволюционные линии пшеницы, в сравнении с диплоидным предком.

В большинстве образцов *Ae. speltoides* повтор Spelt-1 присутствует в избытке (23 - 28 крупных или средних сайтов на диплоидный геном). Это вполне согласуется с оценкой его содержания в геноме – $1,5\text{--}5,3 \times 10^5$ копий (Pestsova *et al.*, 1998; Salina *et al.*, 1998). Эти же авторы показали, что у полиплоидных пшениц число копий Spelt-1 значительно уменьшается – до $10^2\text{--}10^4$. У видов группы Timopheevi уровень повтора был стабильно высоким – порядка 10^3 , а у тетраплоидных и гексаплоидных пшениц группы эммер он значительно варьировал – от менее чем 100 копий до $1,2 \times 10^4$ (Pestsova *et al.*, 1998).

Наши исследования тоже показали, что у видов группы Timopheevi число Spelt-1 локусов достаточно постоянно, хотя по числу и размеру сайтов они существенно уступали *Ae. speltoides*. Таким образом, уровень копийности Spelt-1 повтора в геномах тетраплоидных пшениц группы Timopheevi снижается как за счет сокращения общего числа локусов, так и уменьшения числа копий Spelt-1 повтора в каждом из них.

Эта тенденция еще более выражена у видов второй эволюционной линии - Эммер. Если в группе Timopheevi выявлено в среднем 5,3 Spelt-1 сайта на гаплоидный геном, то у тетраплоидных эммеров 1,19 локуса, а у гексаплоидных видов их еще меньше – 0,43. Низкое содержание повтора у этой группы пшениц в сравнении с *Ae. speltoides* и Timopheevi по-видимому, связано как с уменьшением числа потенциальных сайтов гибридизации, так и количества локусов в конкретном генотипе. С другой стороны, образцы, в которых обнаружено по 3 крупных сигнала на гаплоидный геном, могут приближаться по содержанию Spelt-1 последовательности к видам группы Timopheevi. Сравнение наших данных с результатами "squash"-дот-гибридизации показывают, что действительно, содержание повтора у видов

группы эммера варьирует, достигая в ряде случаев уровня копийности Spelt-1 повтора у видов A¹G-геномной группы (Pestsova *et al.*, 1998).

ЛОКАЛИЗАЦИЯ Fat ПОВТОРА НА ХРОМОСОМАХ ЗЛАКОВ

Характеристика Fat повтора

Вторым направлением работы стало исследование нового, ранее не известного класса ПП – Fat, выделенного в лаборатории молекулярной биологии злаков INRA, г. Клермон-Ферран (Франция) при анализе концевых последовательностей ВАС клонов библиотеки хромосомы 3В пшеницы. В качестве «возможных новых повторов» классифицировано 13% последовательностей, обнаруженных в двух или более копиях (Rauch *et al.*, 2006). Среди них был идентифицирован высококонсервативный элемент длиной 500 п.н., представленный более чем 120 копиями. Так как новый элемент содержал множество сайтов рестрикции эндонуклеазы *FatI*, он был назван Fat. При анализе последовательностей, содержащих полноразмерные копии Fat элемента, было показано, что они организованы в прямые танделы. Каждая единица Fat элемента фланкирована прямыми повторами (GAGAAGCT) и содержит две последовательности, сходные с ориджинами репликации у дрожжей (Huang and Kowalski, 1996).

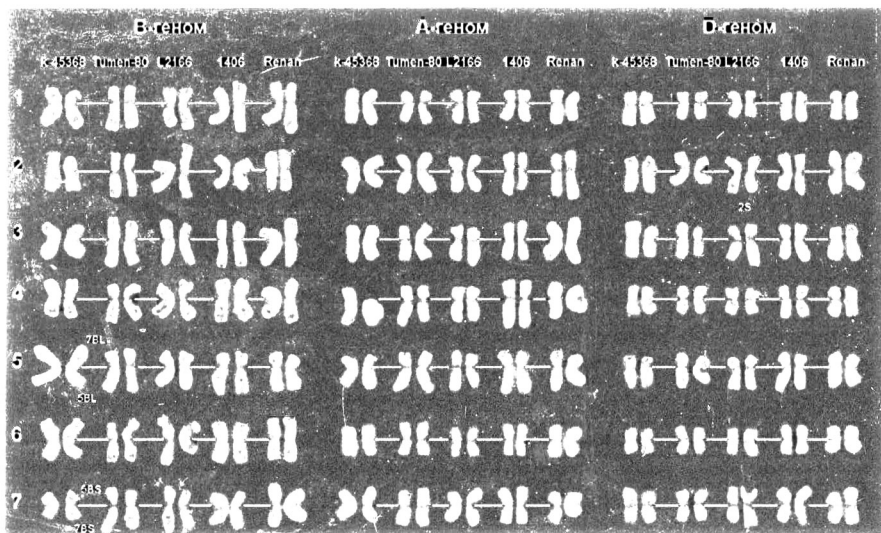


Рисунок 2. Распределение Fat повтора (зеленый) на хромосомах разных сортов мягкой пшеницы. Хромосомы идентифицированы с помощью pSc119.2 зонда (красный).

Локализация Fat последовательности на хромосомах пшеницы

Для анализа распределения Fat элемента нами была разработана система, основанная на использовании зонда, меченного флуоресцеином.

Наиболее интенсивное мечение Fat повтором наблюдалось на хромосомах, содержащих крупные *pAs1* сайты – т.е. на хромосомах D-генома (рис. 2). Рисунок гибридизации на разных хромосомах различались. Так, хромосомы 2D, 3D и 5D метились по всей длине, но неравномерно – ярко флуоресцирующие участки чередовались с более тусклыми. У хромосомы 4D были выявлены крупные, четкие, очень яркие сигналы в проксимальном районе короткого плеча и менее яркие – в длинном. Яркие кластеры Fat повтора обнаружены также на 1D, 6D и 7D хромосомах. Такие же особенности распределения Fat зонда на хромосомах D-генома отмечены во всех изученных сортах мягкой пшеницы (рис. 2).

Хромосомы В-генома гибридизовались с Fat повтором слабо, диффузное мечение было более заметным в проксимальных районах хромосом. В хромосомах А-генома прослеживались сходные тенденции, хотя интенсивность сигналов была немного выше, чем у хромосом В-генома.

Гибридизация Fat элемента на хромосомах злаков – доноров геномов мягкой пшеницы

Разная интенсивность гибридизации А, В и D геномов может быть

связана как с полиплоидизацией, так и быть унаследованной от родительских геномов. Для выявления этого был проведен анализ видов предполагаемых предков пшеницы. В работу были включены:

- *Triticum urartu*, *T. boeoticum*, *T. monococcum* – доноры А- генома;
- *Aegilops speltoides* – донор В- генома;
- *Aegilops tauschii* – донор D- генома.

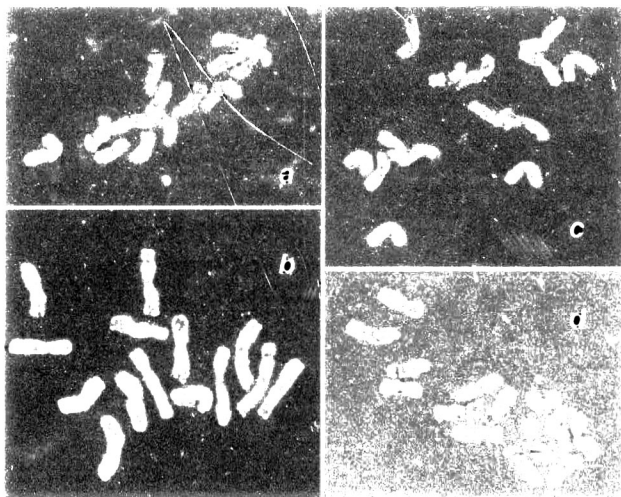


Рисунок 3. Распределение Fat (зеленый) повтора на хромосомах *T. monococcum* (a), *Ae. speltoides* (b), *T. boeoticum* (c) *T. urartu* (d). Для идентификации хромосом использованы зонды *pTa794* (a,d) и *pSc119.2* (b,d) (красный сигнал).

Хромосомы S-генома *Ae. speltoides* показали самую низкую интенсивность гибридизации с Fat повтором (рис. 3b), как и В/Г геномы полиплоидных пшениц. На хромосомах пшениц, предполагаемых доноров А-

генома, сигналы были существенно ярче (рис. 3*a,c,d*). Наиболее четкая гибридизация с изучаемым повтором была выявлена на хромосомах *Ae. tauschii*, предполагаемого предка D-генома (рис. 4*j*). Таким образом, распределение Fat повтора на трех геномах соответствовало таковому у мягкой пшеницы.

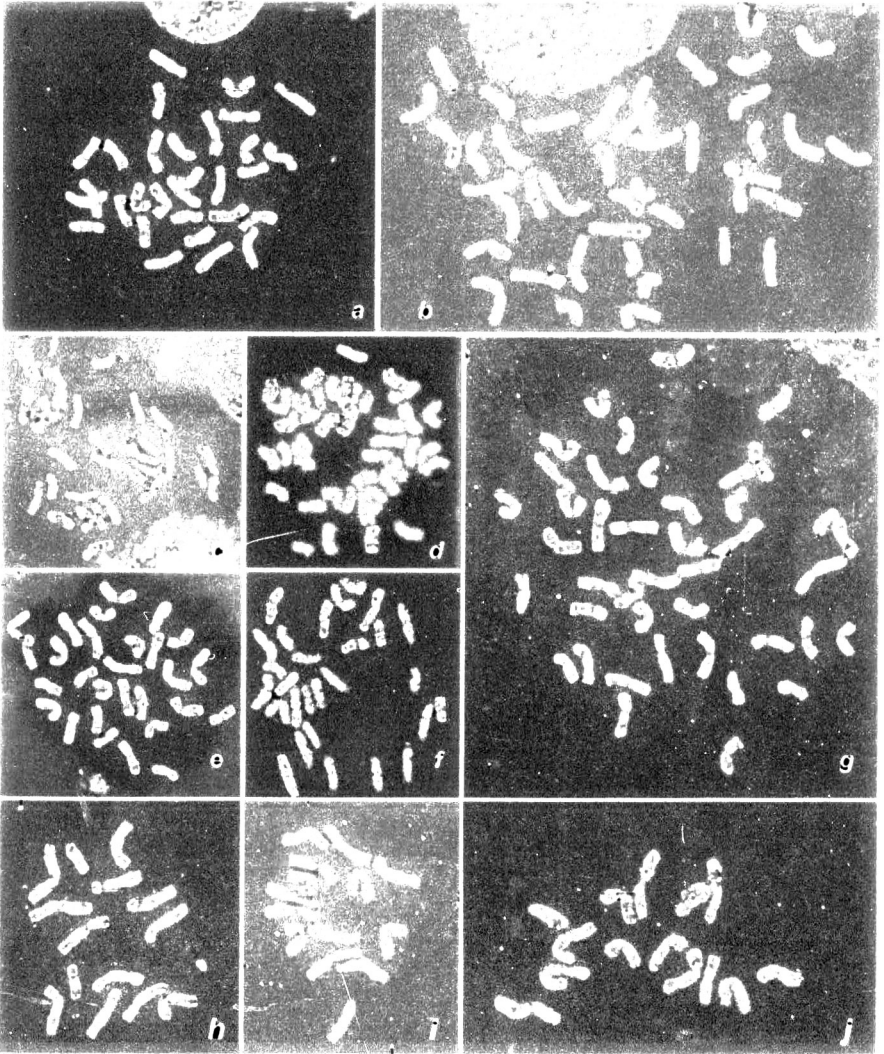


Рисунок 4. Распределение Fat последовательности (зеленый сигнал) на хромосомах полиплоидных видов *Aegilops*: *Ae. ventricosa* SSD32 (a), *Ae. juvenalis*, и-578009 (b), *Ae. cylindrica*, к-1319 (c), *Ae. vavilovii*, TA2655 (d), *Ae. crassa*, к-2485 (e) и IG48581 (f), *Ae. trivialis*, к-1005 (g), *Ae. uniaristata* TA2768 (h), *Ae. comosa*, и-577976 (i), *Ae. tauschii* TQ27 (j). Хромосомы идентифицировали в соответствии с распределением rAs1 зонда (красный).

Локализация последовательности Fat на хромосомах *Aegilops*

Поскольку роды *Aegilops* и *Triticum* находятся в близком генетическом родстве, а *Ae. speltooides* и *Ae. tauschii* послужили донорами В- и D- геномов мягкой пшеницы, мы проанализировали распределение Fat повтора у других видов *Aegilops*.

Диплоидные виды

В работе были изучены диплоидные виды с разными вариантами геномов: *Ae. longissima*, *Ae. sharonensis* и *Ae. bicornis* (секция Sitopsis, S-геном), *Ae. umbellulata* (U-геном), *Ae. uniaristata* (N-геном) и *Ae. comosa* (M-геном). Интенсивность гибридизации Fat повтора у всех видов секции Sitopsis оказалась очень низкой. Несколько более яркое мечение выявлено на хромосомах U-генома, тогда как на хромосомах N- и M-геномов гибридизация с изучаемым повтором была самой четкой (рис. 4*h,i*).

У видов секции Sitopsis очень слабые, редкие сигналы встречались по всей длине хромосом. У *Ae. comosa*, *Ae. uniaristata* и *Ae. umbellulata* гибридизация с Fat проходила в основном в проксимальных районах хромосом. Сигналы имели неравномерный диффузный характер, а интенсивность мечения разных хромосом заметно различалась. Как и в D-геноме *Ae. tauschii* и гексаплоидных видов пшеницы, у всех этих видов наиболее яркие сигналы характеризовали хромосомы 4-й гомеологической группы.

Полиплоидные виды кластера D-геномов

Aegilops tauschii послужил донором «базового» D-генома у ряда полиплоидных видов *Aegilops*. Проведенные ранее исследования показали, что D-геном полиплоидных видов в разной степени модифицирован. Для выявления того, насколько эти изменения затронули Fat повтор, мы проанализировали все виды кластера D-геномов методом FISH.

При гибридизации Fat повтора с хромосомами *Ae. cylindrica* выявлены значительные различия между С- и D- геномами по интенсивности мечения (рис 4*c*). Хромосомы С-генома практически не гибридизовались с Fat. Хромосомы D- генома содержали яркую диффузную метку, на фоне которой определялись крупные Fat сайты, особенно заметные на хромосомах 1, 4, 6 и 7-й групп. Внутривидовой полиморфизм по рисункам гибридизации с Fat повтором не обнаружен. Очень слабые отличия в распределении сигналов от таковых у диплоидного *Ae. tauschii* ssp. *tauschii* подтверждают отсутствие модификаций родительских геномов при образовании этого полиплоида.

Распределение pAs1 и Fat повторов было изучено на хромосомах трех образцов *Ae. ventricosa*, один из которых нес центромерную транслокацию между 1N и 3D хромосомами. Мы не обнаружили различий между образцами

по интенсивности и рисункам мечения хромосом обеими зондами, а распределение pAsI сигналов соответствовало описанному другими авторами (Bardsley, *et al.* 1999; Badaeva, *et al.* 2002).

Несмотря на то, что с Fat повтором гибридизовались хромосомы обоих геномов *Ae. ventricosa*, интенсивность мечения D-генома была выше, чем N-генома (рис. 4а). Эта разница отчетливо видна в кариотипе линии, несущей транслокацию T1N:3D, где сигнал на плече хромосомы D-генома был значительно ярче, чем на плече хромосомы N-генома. По-видимому, различия в интенсивности мечения отражают более низкое содержание Fat последовательности в геноме родительского вида *Ae. uniaristata*, а не изменения в уровне копийности повтора вследствие полиплоидизации.

Распределение Fat последовательности на хромосомах D-генома *Ae. ventricosa* показало большее сходство с образцом подвида *tauschii*, однако, между ними были обнаружены небольшие различия по рисунку мечения некоторых хромосом. Так, у *Ae. ventricosa* сигналы на хромосоме 3D оказались более яркими, на их фоне были четко видны теломерные и дистальный кластеры Fat повтора, которые или отсутствовали, или были очень мелкими у *Ae. tauschii*.

Интересно, что распределение Fat последовательности изменилось и в некоторых хромосомах N-генома *Ae. ventricosa*. Так, например, в проксимальной части длинного плеча 4N хромосомы *Ae. uniaristata* обнаружен крупный, ярко флуоресцирующий район (рис. 3h), который был более тусклым у тетраплоидного потомка. Сигналы в проксимальной части хромосомы 1N, наоборот, были ярче у диплоидного предка. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают точку зрения о том, что оба генома *Ae. ventricosa* модифицированы относительно исходных за счет структурных перестроек хромосом и перераспределения семейств ПП.

Особый интерес представлял анализ распределения Fat последовательности на хромосомах тетраплоидного *Ae. crassa*. Считается, что он является наиболее древним полиплоидным видов *Aegilops* (Zhang and Dvorak, 1992), который в свою очередь дал начало трем разным гексаплоидным видам. Получены данные о значительных изменениях его D¹-генома. Происхождение второго генома *Ae. crassa* долгое время оставалось неизвестным, в связи с чем его обозначали символом X^{cr} (Dvorak, 1998). Лишь сравнительно недавно с помощью молекулярного (Zhang and Dvorak, 1992; Dubkovsky and Dvorak, 1995) и цитогенетического анализа, основанного на сравнении распределения локусов 5S и 45S рПНК генов (Badaeva *et al.*, 1998), удалось установить, что X^{cr} геном *Ae. crassa* является производным S-генома вымершего в настоящее время вида секции *Sitopsis*.

Локализация Fat последовательности на хромосомах пяти образцов *Ae. crassa* (IG-48477, IG-48581, IG-48585, IG-110807 и IG-115755) показала высокую интенсивность мечения обоих геномов этого вида (рис. 4e,f). Совместное использование pAsI и Fat зондов позволило безошибочно идентифицировать практически все хромосомы, рисунки мечения которых оказались идентичными у всех образцов. Распределение Fat и pAsI повторов на хромосомах D¹-генома *Ae. crassa* отличалось от такового у диплоидного предка *Ae. tauschii* (рис. 4j), а также других полиплоидных видов D-геномного кластера. Наиболее значительные различия выявлены по хромосоме 2D¹, тогда как рисунки мечения хромосом 3D¹, 4D¹, 7D¹ практически не изменились. На хромосоме 4D¹, как и у других хромосом 4-й гомеологичной группы, обнаружен крупный Fat кластер в коротком плече, несколько менее яркий сигнал выявлен на хромосоме 7D¹. Небольшой сигнал Fat повтора, выявленный в коротком плече хромосомы 3D¹ *Ae. crassa*, никогда не встречался у других видов. В то же время, сигналы на хромосоме 1D¹ этого полиплоида были заметно слабее.

В X^{cr}-геноме крупные кластеры Fat последовательности видны на хромосомах 3-й (короткое плечо), 6 и 7-й (длинное плечо) гомеологичных групп. Следует отметить, что ни в одном из исследованных диплоидных видов секции Sitopsis, предполагаемых предков X^{cr}-генома, такой картины не наблюдалось, а интенсивность мечения хромосом была крайне низкой. Появление четких Fat кластеров на хромосомах X^{cr}-генома *Ae. crassa* можно объяснить транслокациями хромосом D¹-генома, происходившими при его образовании. В то же время, межгеномные перестройки не могли обусловить значительное повышение общей интенсивности гибридизации хромосом X^{cr}-генома с Fat повтором. Можно предположить, что при образовании и последующей эволюции *Ae. crassa* произошла экспансия Fat последовательности из D-генома в хромосомы его второго генома.

Известно, что *Ae. crassa* послужил предковой формой при образовании *Ae. trivialis* (геном D¹X^{cr}D²), *Ae. vavilovii* (геном D¹X^{cr}S) и *Ae. juvenalis* (геном D¹X^{cr}U). Представлялось интересным сравнить распределение Fat и pAsI сайтов на их хромосомах. Гексаплоидный *Ae. trivialis* в целом был сходен с обоими родительскими видами (рис. 4g). Ранее на основании данных С-бэндинга и FISH с pAsI повтором у него была идентифицирована видоспецифическая транслокация между 2X^{cr} и 4D² хромосомами (Badaeva *et al.*, 1998, 2002). Настоящее исследование подтвердило наличие этой перестройки. Более того, совместное использование двух зондов, специфичных для D-генома, позволило уточнить комбинацию хромосом, участвующих в другой транслокации – T4X^{cr}:6X^{cr}, перешедшей в геном *Ae. trivialis* от родительской формы *Ae. crassa*.

Интенсивность мечения Fat повтором хромосом второго гексаплоидного вида комплекса *Crassa* – *Ae. vavilovii* (рис. 4d), оказался существенно ниже, чем у *Ae. trivialis* (рис. 4g). Это обусловлено тем, что, как и диплоидные виды секции *Sitopsis*, S^v -геном содержит сравнительно мало Fat последовательности. В то же время, характер мечения и распределение сигналов на хромосомах X^{cr} - и D^1 -геномов полностью соответствовали таковым у *Ae. crassa*. Структура хромосом $4X^{cr}$ и $6X^{cr}$ *Ae. vavilovii* аналогична таковым у *Ae. trivialis*. Тот факт, что рисунок мечения хромосомы $6X^{cr}$ оказался практически идентичным таковому у хромосомы $6S^v$, еще раз подтверждает предположение о том, что у полиплоидных видов комплекса *Crassa* именно этот вариант хромосом $4X^{cr}$ и $6X^{cr}$ был исходным.

По данным С-бэндинга и распределения pAs1 и pAs119.2 зондов, а также локализации сайтов 5S и 45S рДНК, *Ae. juvenalis* характеризуется значительными модификациями родительских геномов (Badaeva *et al.*, 2002). Было показано, что формирование этого полиплоида сопровождалось несколькими крупными транслокациями, однако идентифицировать участвовавшие в них хромосомы в ряде случаев было невозможно. Анализ *Ae. juvenalis* методом FISH с двумя зондами, специфичными для D-генома (рис. 4b), позволил уточнить структуру перестроенных хромосом в нескольких транслокациях.

У этого вида было также обнаружено изменение характера гибридизации Fat с хромосомами U^j -генома. Так, в дистальной части длинного плеча хромосомы $2U^j$ выявлен четкий кластер Fat повтора, а еще более крупный сайт находился в проксимальном участке этого же плеча, чего не наблюдалось у диплоидного *Ae. umbellulata*. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают, что образование *Ae. juvenalis* сопровождалось значительной реорганизацией родительских геномов, включавшей структурные перестройки хромосом и перераспределение последовательностей Fat и pAs1. Более того, изменения происходили не только в D^1 - и X^{cr} -геномах этого полиплоида, но в равной степени затрагивали и хромосомы его третьего гена – U^j .

Таким образом, распределение Fat повтора было высоко консервативным как для D-генома в целом, так и отдельных хромосом. Наличие кластерных сигналов в проксимальных участках хромосом 1D, 4D, 6D и 7D позволяет использовать этот зонд для их идентификации, а сочетание двух специфичных для D-генома последовательностей Fat и pAs1 существенно повысило разрешающую способность FISH. Использование этих зондов позволяет не только выявлять отдельные хромосомы D-генома, но и идентифицировать их отдельные районы, что имеет большое значение при анализе эволюционных процессов.

Полиплоидные виды *Aegilops* кластера U-геномов

Aegilops umbellulata послужил донором U-генома семи полиплоидных *Aegilops*, отнесенных соответственно к кластеру U-геномов (Kimber and Feldman, 1987; Kimber and Yen, 1988). Было показано, что U-геном *Ae. umbellulata*, содержит существенно меньше копий Fat элемента в сравнении с D-геномом. Диффузные Fat сигналы средней интенсивности располагались в проксимальных районах хромосом этого вида, тогда как кластеров зонда в геноме *Ae. umbellulata* обнаружено не было.

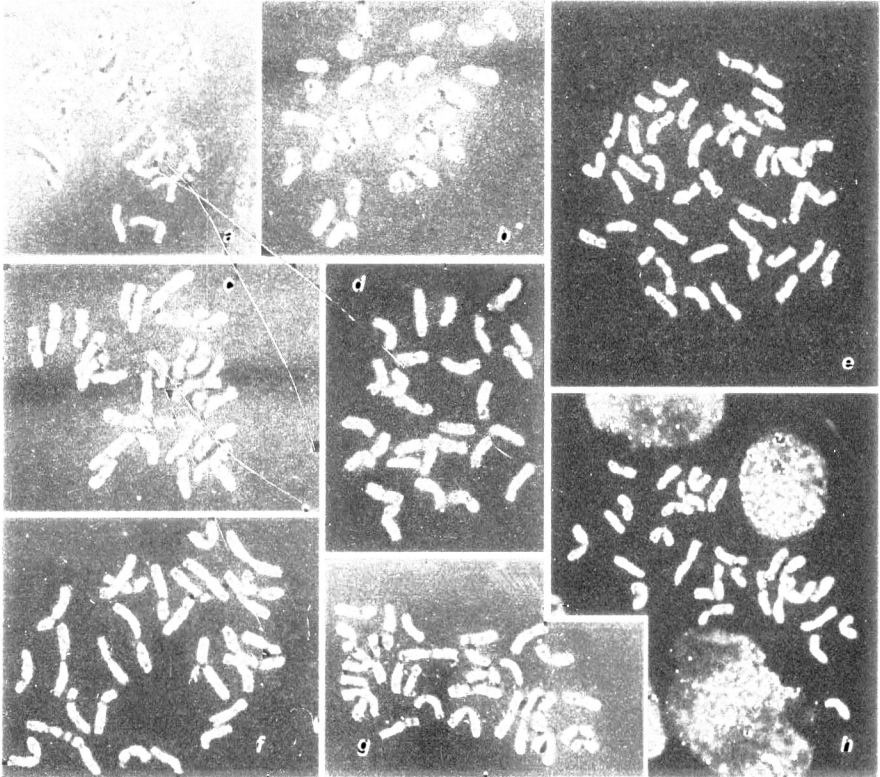


Рисунок 5. Распределение Fat повтора (зеленый) на хромосомах *Ae. triuncialis* (a), *Ae. triaristata* (b), *Ae. geniculata* (c), *Ae. biuncialis* (d), *Ae. recta* (e), *Ae. kotschy* (f), *Ae. peregrina* (g), *Ae. columnaris* (h). Для идентификации хромосом использованы pAs1 (c,e) или pSc119.2 (a,b,d,f-h) зонды (красный).

При гибридизации повтора с хромосомами большинства полиплоидных *Aegilops* кластера U-геномов наблюдалась сходная картина (рис. 5). Однако, в кариотипах нескольких видов, наряду с диффузной меткой, определялись яркие кластеры Fat элемента в некоторых хромосомах. При этом положение многих из этих кластеров было высоко консервативным. Существенных различий между геномами в составе изученных полиплоидов по содержанию

и распределению Fat последовательности не выявлено. Это может свидетельствовать о том, что в этой группе полиплоидизация привела к перераспределению и, возможно, амплификации Fat последовательности в определенных локусах хромосом.

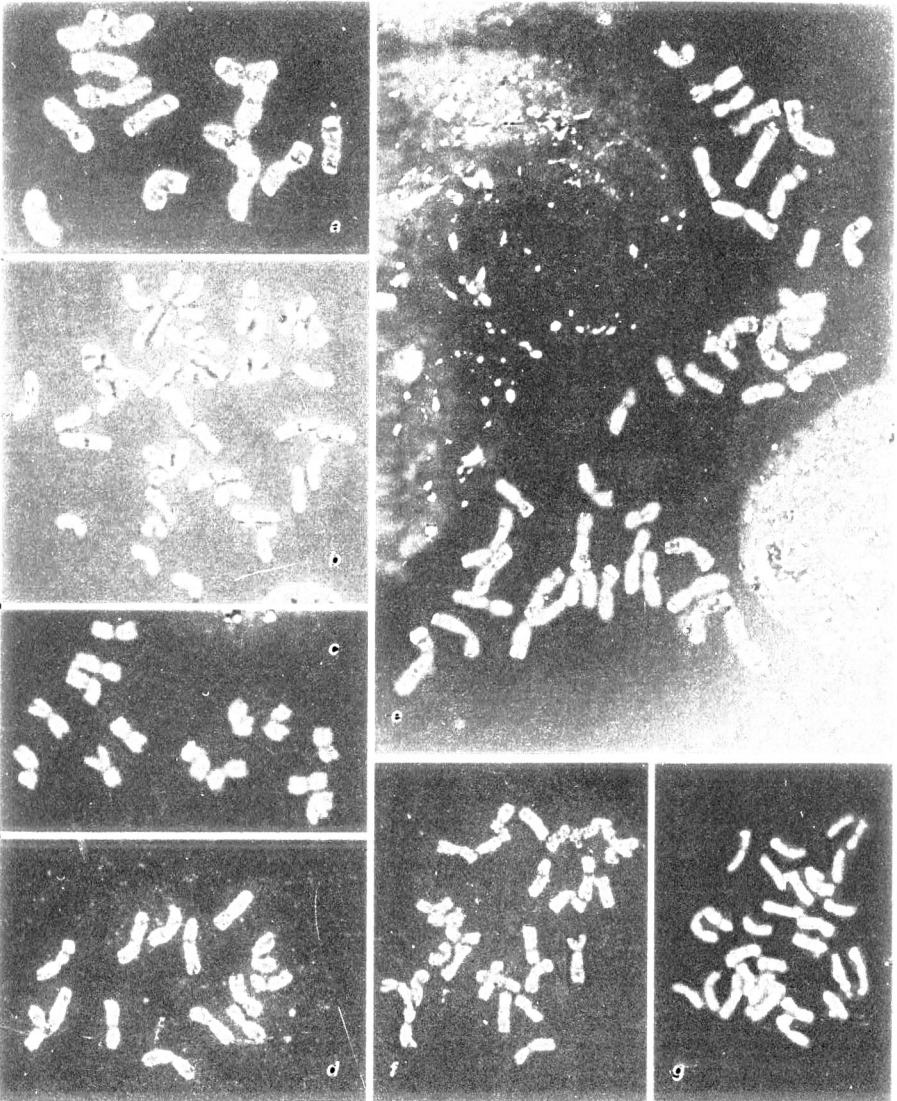


Рисунок 6. Локализация Fat повтора (зеленый) на хромосомах ржи (*Secale cereale*, a), пырея (*Agropyron intermedium*, b), ячменя (*Hordeum vulgare*, c; *H. chilense*, d; *H. geniculatum*, f), тритикале (e) и овса (*Avena magna*, g). Идентификацию хромосом проводили с помощью pSc119.2 (a,e), pAs1 (b,d,f) и pTa71 (c,g) зондов (красный).

Локализация Fat последовательности на хромосомах других злаков

Для установления наличия и оценки содержания Fat элемента в геномах других злаков, близко или отдаленно родственных пшенице, проведена гибридизация *in situ* на хромосомах ржи (*Secale cereale*) – геном R, четырех видов ячменя (*Hordeum*) – геномы I; H; XX₁, овса (*Avena magna*) – геном AC и пырея (*Agropyron intermedium*) – геном E₁E₂N.

Согласно полученным данным, у овса *Avena magna* и двух видов ячменя – *H. vulgare* и *H. spontaneum* с геномом I, Fat повтор не обнаружен (рис. 6g). У двух других ячменей – *H. chilense* и *H. geniculatum*, содержащих геномы H и XX₁, было выявлено очень слабое диффузное мечение хромосом (рис. 6d,f). Четкая гибридизация с Fat повтором обнаружена на хромосомах R-генома ржи (рис. 6a). Сигналы в основном слабые и распределены диффузно в проксимальной области хромосом, однако у трех хромосом на их фоне располагались яркие кластеры Fat повтора. Эти особенности распределения зонда сохранились и в геноме пшенично-ржаного амфилоида – тритикале (рис. 6e).

Самую интересную картину гибридизации с Fat повтором наблюдали на хромосомах гексаплоидного пырея *Agropyron intermedium*, у которого 14 из 42 хромосом в его кариотипе интенсивно метились этим зондом (рис. 6b).

Fat последовательность в эволюции злаков

Локализация Fat повтора на хромосомах злаков методом гибридизации *in situ* выявила следующие особенности его распределения. Во-первых, он характеризуется дисперсным характером мечения, несмотря на тандемный тип организации в геноме. Его можно отнести к классу интеркалярных, геномно-специфичных тандемных повторов злаков с дисперсно-кластерным характером распределения.

Во-вторых, Fat повтор локализован преимущественно в проксимальных районах хромосом, которые характеризуются низким содержанием генов (Gill *et al.*, 1996; Schmidt, 2002; Randhawa *et al.*, 2004), что особенно явно проявляется у видов с крупными хромосомами (Moore, 2000). Считается, что увеличение размеров хромосом происходит за счет возрастания протяженности участков некодирующей ДНК (Bennetzen *et al.*, 1998; Moore, 2000; Sandhu and Gill, 2002). Можно предположить, что Fat относится к группе повторов, экспансия которых внесла вклад в увеличение размеров хромосом злаков.

В соответствии с полученными данными, эта последовательность в процессе эволюции злаков могла впервые появиться на этапе дивергенции рода *Hordeum* от общего предка, т.е. приблизительно 11 миллионов лет назад (Huang *et al.*, 2002). При обособлении и эволюции других таксонов

возрастание уровня копийности Fat элемента, по-видимому, происходило неравномерно. Это хорошо видно на хромосомах пырея - *Agropyron intermedium*, пшениц и *Aegilops*. Интересно, что в роде *Aegilops* содержание Fat последовательности было значительно выше в геномах видов, хромосомы которых хорошо гибридизовались с pAsI повтором – *Ae. tauschii* и *Ae. uniaristata*, причем наибольшее число копий Fat выявлялось в хромосомах 4-й гомеологической группы, независимо от общей интенсивности гибридизации хромосом с этой последовательностью.

Формирование полиплоидных форм могло приводить как к возрастанию содержания Fat элемента в хромосомах родительских геномов, как было отмечено, в частности, в X^{cr}-геноме *Ae. crassa*, так и, возможно, к его частичной элиминации - А-геномы полиплоидных пшениц. У многих полиплоидных видов, однако, мы не выявили заметных изменений интенсивности гибридизации хромосом родительских геномов.

Высокое содержание Fat последовательности в D-геноме пшениц и эгилопсов и N-геноме пырея, а также специфичность его распределения на хромосомах позволяют рекомендовать этот повтор, в сочетании с другими клонированными семействами повторяющихся ДНК, для идентификации хромосом и анализа эволюционных процессов на хромосомном уровне.

ВЫВОДЫ

1. С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* на хромосомах разных злаков впервые исследовано распределение нового семейства высокоповторяющихся последовательностей ДНК Fat, выделенного из ВАС библиотеки хромосомы 3В мягкой пшеницы. Показано, что она относится к ранее неизвестному классу высокоповторяющихся, тандемно организованных последовательностей ДНК с дисперсно-кластерным характером распределения в геноме.

2. Содержание Fat элемента в геномах разных видов злаков значительно варьирует. Наиболее высокая интенсивность гибридизации выявлена в D-геноме пшениц и эгилопсов и N-геноме пырея *Agropyron intermedium*, тогда как у овса и культурного ячменя *H. vulgare* данная последовательность не обнаружена, однако она присутствовала в минимальных количествах у других представителей рода *Hordeum*. На основании этого сделано заключение, что в процессе эволюции злаков Fat элемент мог впервые появиться после дивергенции овсов, во время обособления ячменей от общего предка.

3. Наиболее интенсивная гибридизация Fat повтора с формированием крупных кластерных сигналов характеризует хромосомы 4-й гомеологической группы пшениц и *Aegilops*, и может являться ее маркером. Специфичность

распределения этой последовательности на хромосомах D-генома пшениц и эгилопсов позволяет использовать ее в гибридизации *in situ* как молекулярно-цитогенетический маркер для идентификации хромосом и исследования эволюционных процессов на хромосомном уровне.

4. С помощью гибридизации *in situ* выявлен высокий внутривидовой полиморфизм полиплоидных пшениц по распределению, числу и размерам локусов семейств теломеро-ассоциированных tandemных повторов Spelt-1 и Spelt-52. Показано, что снижение уровня копийности Spelt-1 повтора у полиплоидных пшениц происходит за счет уменьшения числа сайтов гибридизации и уменьшения их размеров в сравнении с предковой формой. Различия в содержании повтора между двумя родственными группами пшениц - Timopheevi и Emmer, могут быть связаны с «эффектом основателя» или с тем, что в процессе эволюции происходила постепенная элиминация повтора, сильнее выраженная у филогенетически более древней группы Emmer.

5. Показано наличие локусов В/G-геномно-специфичного повтора Spelt-1 на двух хромосомах A/A¹ геномов полиплоидных пшениц. Их появление обусловлено переносом фрагмента хромосомы G-генома на хромосому A¹-генома (6A¹S) в результате видоспецифической транслокации T6A¹:1G:4G – у видов группы Timopheevi, и возможной амплификацией последовательности, исходно присутствовавшей у диплоидного предка – в обеих группах полиплоидных пшениц (2A/2A¹).

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

- 1 Badaeva E.D., Friebe B., Zoshchuk S.A., Zelenin A.V., Gill B.S. Molecular-cytogenetic analysis of tetraploid and hexaploid *Aegilops crassa* // Chrom. Res. 1998. V.6. № 8. P.629-637.
- 2 Badaeva E.D., Friebe B., Zoshchuk S.A., Zelenin A.V., Gill B.S. Genome differentiation in diploid and polyploidy *Aegilops* species // University Extension Press, University of Saskatchewan. Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp., Saskatoon, Saskatchewan, Canada 2-7 August 1998. V.1 (oral presentations). P.61-64.
- 3 Badaeva E.D., Amosova A.V., Samatadze T.E., Zoshchuk S.A., Shostak N.G., Chikida N.N., Zelenin A.V., Raupp W.J., Friebe B., and Gill B.S. Genome differentiation in *Aegilops*. 4. Evolution of the U-genome cluster // Plant Systematics and Evolution. 2004. V.246. P.45-74.
- 4 Salina E.A., Lim K., Badaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Y., Zoshchuk S.A., Leitch A.R. Phylogenetic

reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids // *Genome*. 2006. V.49. P.1023-1035.

5. Зоцук С.А., Бадаева Е.Д., Зоцук Н.В., Адонина И.Г., Щербань А.Б., Салина Е.А. Исследование внутривидовой дивергенции пшениц группы *Timopheevi* методом гибридизации *in situ* с семействами тандемных повторов *Spelt-1* и *Spelt-52* // *Генетика*. 2007. Т.43. №6. С.636-645.

Тезисы

1. Бадаева Е.Д., Амосова А.В., Зоцук С.А., Саматадзе Т.Е., Салина Е.А., Зеленгин А.В. Использование методов хромосомного анализа в исследованиях эволюции злаков. Сб. тезисов V Международного совещания и школы молодых ученых по кариологии, кариосистематике и молекулярной систематике растений. С-Петербург, 2005, С.11-12.
2. Зоцук С.А., Зоцук Н.В., Бадаева Е.Д. Исследование эволюции видов рода *Aegilops* с использованием нового класса цитогенетических маркеров. Сб. тезисов VII международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». Пушкино, 2007, С.118-119.
3. Зоцук С.А., Зоцук Н.В., Бадаева Е.Д. Использование повторяющихся последовательностей ДНК при исследовании эволюции видов пшениц и *Aegilops* методом гибридизации *in situ*. Сб. тезисов II Вавиловской международной конференции «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке». Санкт-Петербург, 2007, С.279-280.
4. Зоцук С.А., Зоцук Н.В., Бадаева Е.Д. Исследование эволюции злаков с использованием нового семейства повторяющихся последовательностей *Fat*. Сб. тезисов XII Делегатского Съезда Российского Ботанического Общества. Петрозавадск, 2008.
5. Зоцук Н.В., Зоцук С.А., Амосова А.В., Бадаева Е.Д. Использование последовательностей ДНК *Spelt-1* и *Spelt-52* при исследовании эволюции пшениц и эгилопсов методом гибридизации *in situ*. Сб. тезисов XII Делегатского Съезда Российского Ботанического Общества. Петрозавадск, 2008.

Заказ № 17-а/01/2009 Подписано в печать 13.01.2009 Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1,5



ООО "Цифровичок", тел. (495) 649-83-30; (495) 778-22-20
www.cfr.ru ; e-mail: info@cfr.ru

